

(12)特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局(43) 国際公開日
2004 年 7 月 15 日 (15.07.2004)

PCT

(10) 国際公開番号
WO 2004/058296 A1

- (51) 国際特許分類⁷: A61K 38/46, A61P 19/00, 19/08
- (21) 国際出願番号: PCT/JP2003/016580
- (22) 国際出願日: 2003 年 12 月 24 日 (24.12.2003)
- (25) 国際出願の言語: 日本語
- (26) 国際公開の言語: 日本語
- (30) 優先権データ:
特願 2002-373527
2002 年 12 月 25 日 (25.12.2002) JP
特願 2003-187675 2003 年 6 月 30 日 (30.06.2003) JP
- (71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 小森 博達 (KOMORI, Hiromichi) [JP/JP]; 〒184-0015 東京都小金井市 貫井北町 2-11-19 Tokyo (JP).
- (71) 出願人 および
(72) 発明者: 波呂 浩孝 (HARO, Hirotaka) [JP/JP]; 〒152-0013 東京都目黒区南 2-10-8 Tokyo (JP).
- (74) 代理人: 高木 千嘉, 外 (TAKAGI, Chiyoshi et al.); 〒102-0083 東京都千代田区麹町一丁目 10 番地 麹町広洋ビル すばる特許事務所 Tokyo (JP).
- (81) 指定国 (国内): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.
- (84) 指定国 (広域): ARIPO 特許 (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア特許 (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ特許 (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI 特許 (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).
- 添付公開書類:
— 国際調査報告書
— 請求の範囲の補正の期限前の公開であり、補正書受領の際には再公開される。
- 2 文字コード及び他の略語については、定期発行される各 PCT ガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語のガイダンスノート」を参照。

(54) Title: REMEDY FOR DEGENERATIVE INTERVERTEBRAL DISCS

(54) 発明の名称: 椎間板変性治療剤

(57) Abstract: To treat diseases accompanied by degenerative intervertebral discs, in particular, disk herniation, lumbar pain, discopathy and osteoarthritis of the spine, it is intended to provide a drug for administering a human-origin protease directly to an affected part of such a disease accompanied by degenerative intervertebral discs. As the human-origin protease, use can be made of MMP-3, MMP-7, etc.

(57) 要約: 椎間板変性を伴う疾患、特には椎間板ヘルニア、腰痛症、椎間板症および変形性脊椎症を治療するため、ヒト由来の蛋白質分解酵素を、椎間板変性に伴う疾患の患部に直接投与する薬剤を提供する。ヒト由来の蛋白質分解酵素としては、MMP-3、MMP-7 等が使用できる。

BEST AVAILABLE COPY

椎間板変性治療剤

技術分野

5 本発明は、ヒト由来の蛋白質分解酵素を有効成分として含有する椎間板変性に伴う疾患の治療剤に関する。この治療剤は、椎間板変性に伴う疾患の患部に直接投与され、例えば椎間板ヘルニア、腰痛症、椎間板症、変形性脊椎症の治療に有効であり、ヘルニアの自然退縮を促進する。

背景技術

10 脊椎体と脊椎体の間に存在する円盤状の軟骨体である椎間板は、内側の髄核とこれを取り囲む外側の線維輪から構成され、プロテオグリカン、アグリカン、II型コラーゲンなどの軟骨成分からなる。椎間板は、主に加齢と共に生じる椎間板中の水の含量の減少により弾力性が失われ、椎間板の軟骨成分の消失と線維組織の増生が認められ、いわゆる内層の髄核と外層の線維輪の2重構造が破綻する。
15 これらの変化を椎間板変性とよぶ。この椎間板変性は加齢性変化であり、20才から始まって、70才までにはほぼ全ての椎間板組織で変性変化を認める。椎間板ヘルニアは変性髄核が脆弱した線維組織を破って脊柱管内に脱出して、神経根や馬尾を圧迫して疼痛や麻痺などを起こすものである。腰痛症は、骨代謝異常、外傷、腫瘍などの原因で起きるものもあるが、椎間板の退行変性に起因する場合
20 が多い。

磁気共鳴画像法 (magnetic resonance imaging: MRI) は、椎間板変性を診断するために広く利用されている。レントゲンと異なり被爆もしないために、頻回の検査の施行が可能である。経時的に撮像を行うことにより、椎間板ヘルニアでは経時的に体積が減少する自然退縮機序が認められることがわかってきた。また、造影剤ガドリニウム-ジエチレントリアミンペンタ酢酸 (Gd-DTPA)
25 を用いることで椎間板ヘルニア組織に造影効果が確認された場合には、ヘルニア内での血管増生が盛んであると判断でき、より自然退縮が起きることが期待でき

る。これにより、予後診断も可能となる。

手術により摘出されたヘルニア塊を免疫組織学的に検討すると、ヘルニア塊の軟骨基質の中に新生血管の増生と多数のマクロファージを中心とした炎症性細胞の浸潤が認められる (Haro et al., Spine 21(1996), 1647-1652)。また、浸潤してきたマクロファージや椎間板内の軟骨細胞がマトリックスメタロプロテアーゼ (Matrix metalloproteinase : MMP) に属するMMP-3とMMP-7を強発現していることが確認された (Haro et al., Spine 22(1997), 1098-1104 および Haro et al, J. Spinal. Disorders 12(1999), 245-249)。MMPは中性領域で主に作用する酵素で、関節内や椎間板組織では生理的に発現している。MMP-3とMMP-7は軟骨組織の主成分であるプロテオグリカン、アグリカンを基質としている。このため、椎間板ヘルニア内ではMMP-3とMMP-7がヘルニア組織の分解及び退縮に重要な作用を有することが推測されている。

また、野生型マウスの椎間板を蛋白分解性のマクロファージと共培養した場合には、MMP-3欠損型マウスの椎間板とマクロファージとの共培養の場合に比べて椎間板重量の減少が大きかった。また、野生型マウスおよびMMP-3欠損マウスを用いた実験によって、MMP-3がマクロファージを椎間板内に走化させる作用のある (MMP-3がマクロファージに対する走化性因子として働く) ことも確認されている (Haro et al., J. Clin. Invest. 105(2) (2000), 133-141)。

MMP-7は炎症性サイトカインであるTNF- α を誘導し、そのTNF- α が椎間板細胞におけるMMP-3の産生を促進することも報告されている (Haro et al., J. Clin. Invest. 105(2) (2000), 143-150)。しかし、ヒトの椎間板ヘルニアで発現しているMMP-3、MMP-7等のヒト由来の蛋白質分解酵素を治療剤として使用する試みは全くなされていない。

椎間板ヘルニアの外科治療は、ヘルニア塊を外科的に摘出して神経の除圧をはかることが広く行われている。しかし、本疾患が青年層や中年層に多く、スポーツ選手にも比較的多く認められることから、手術治療ではなく非侵襲的な治療が

求められている。

すでに、米国やヨーロッパでは、植物から抽出したキモパpain等の酵素を椎間板ヘルニア中に注入する治療が行われているが、免疫反応や神経毒性などが報告されている。また、ヘルニア患部にキモパpainを注入した場合は、蛋白分解により生じたヘルニア腔が時間経過により回復することが報告されているが、これは軟骨マトリックスではなく、線維性の結合組織が造生してくるためであると考えられている。イヌの椎間板内にキモパpainを注入した場合の組織学的観察によれば、髄核中心が線維軟骨組織に置換されていたことが報告されている

(Kudo et al., J. Vet. Med. Sci. 1993, Apr, 55(2) 211-5)。また、本発明者の実験によれば、イヌの椎間板ヘルニアにキモパpainを注入した例では、軟骨のマトリックスが髄核部と線維輪全体にわたって分解され、残存した軟骨細胞は大幅に減少しており大きく損傷されていた。このようにキモパpainによりヘルニアを溶解した場合は、椎間板の再生能が無くなるか低下すると考えられる。軟骨細胞はマトリックス中に浮遊した状態で機能を保持するため、マトリックスは椎間板再生に不可欠のものである。このような公知の事実および本発明者が確認した事実を勘案した場合、ヘルニア患部に蛋白分解酵素を直接投与し、変性髄核を除去する従来の方法では、軟骨細胞が椎間板再生機能を保持するために必要なマトリックスを保持することが困難であると思われた。

20 発明の開示

驚くべきことにヒト由来の蛋白分解酵素であるMMP類をヘルニア中に注入した場合には、椎間板ヘルニアを退縮させるが、正常の軟骨細胞には損傷を与えないことが見出された。すなわち、椎間板再生機能を保ったまま椎間板ヘルニアを溶解することができたのである。軟骨細胞が機能を維持するにはマトリックスが不可欠である。したがって、本発明はヒト由来の蛋白分解酵素であるMMP類をヘルニア中に注入することにより、正常軟骨細胞を温存しながらヘルニアを選択的に退縮させるという画期的な知見に基づくものである。この発明によって、こ

れまでのキモパインによる正常軟骨の損傷と言う弊害の可能性のない全く新しいヘルニア治療が可能となる。

本発明は、ヒトの椎間板ヘルニアの自然退縮に関与していると考えられるヒト由来の蛋白質分解酵素を有効成分とし、変性した椎間板に直接投与される椎間板変性に伴う疾患の治療剤を提供するものである。また、ヒト由来の蛋白質分解酵素を変性した椎間板に直接投与する椎間板変性に伴う疾患の治療方法を提供するものである。本発明の治療剤によって治療される疾患は、椎間板の変性に伴う疾患であり、例えば、椎間板ヘルニア、腰痛症、椎間板症、変形性脊椎症が挙げられる。

これまでの研究によって椎間板ヘルニアの退縮に関与していると考えられる物質としては、上記したMMP-3およびMMP-7が挙げられている。また、MMP-8、MMP-13、MT1-MMP (MMP-14) およびアグリカネース (aggrecanase) も同様の作用を有すると考えられる。MMP-3 (E.C. 3.4.24.17) は、stromelysin-1 または transin と呼ばれ、フィブロネクチン、ラミニン、プロテオグリカン、各種コラーゲンなどを分解する。MMP-7 (E.C. 3.4.24.33) は、matrilysin または PUMP と呼ばれ、タイプ IV およびタイプ X コラーゲン、エラスチン、フィブロネクチン、ゼラチン、ラミニン、プロテオグリカンなどを分解する。MMP-8 (E.C. 3.4.24.34) は、collagenase-2 または neutrophil collagenase と呼ばれ、タイプ I コラーゲンをタイプ II やタイプ III よりも優先的に分解する。MMP-13 は、collagenase-3 と呼ばれ、タイプ II コラーゲンに対して特異性が高い。MT1-MMP (membrane type-1 matrix metalloproteinase) は、MMP-14 と呼ばれ、プロMMP-2 およびプロMMP-13 を活性化する。アグリカネースは、ADAM-TS (a disintegrin and metalloproteinase-thrombospondin) ファミリーに属し、軟骨アグリカンを分解する。

これらの蛋白質分解酵素は、近年リコンビナント法によって製造され、供給されるようになった。本発明者は、これらの蛋白質分解酵素を椎間板変性に伴う疾

患、特にヘルニアへの注入療法に使用してその有効性を確認した。さらに、これらのヒト由来の蛋白質分解酵素がキモパインのもつ軟骨細胞を損傷させる可能性のないことを確認して本発明を完成した。

5 図面の簡単な説明

図1は、椎間板ヘルニア検体をMMP-3、MMP-7、その混合物、ポジティブコントロールとしてのキモパイン、およびコントロール（DMEM培地）と培養した場合の重量変化を示す図である。

10 図2は、椎間板ヘルニア検体をMMP-3、MMP-7、その混合物、ポジティブコントロールとしてのキモパインと培養して得られた組織標本を、サフラニンOで染色した結果を示す図である。

15 図3は、ウサギの椎間板にMMP-3、MMP-7、ポジティブコントロールとしてのキモパイン、およびコントロールとしての生理食塩水（NS）を注入し、1週間後に屠殺して作成した椎体標本をサフラニンOで染色した結果を示す図である。

図4は、ヘルニアを自然発症したミニチュアダックスフンドから摘出した、ヘルニアの組織標本（ヘマトキシリンエオジン染色）の顕微鏡写真を示す図である。

図5は、ヘルニアを自然発症しているビーグル犬の椎間板にX線透視下でMMP-7を注入する図である。

20 図6は、ヘルニアを自然発症しているビーグル犬の椎間板にMMP-7を注入する前（Pre）と注入後（Post）のMRI（脂質強調画像T1）である。

図7は、ヘルニアを自然発症しているビーグル犬の椎間板にMMP-7を注入する前（Pre）と注入後（Post）のMRI（水分強調画像T2）である。

25 図8は、ヘルニアを自然発症しているビーグル犬の椎間板にMMP-3を注入する前（Pre）と注入後（Post）のMRI（水分強調画像T2）である。

図9は、ヘルニアを自然発症しているビーグル犬の椎間板にMMP-7およびコントロールとしての生理食塩水を注入し、1週間後に屠殺して作成した椎体標

本をカットした状態を示す図である。

図 10 は、ヘルニアを自然発症しているビーグル犬の椎間板に MMP-7 およ
びコントロールとしての生理食塩水を注入し、1 週間後に屠殺して作成した椎体
標本をサフラニン O で染色した結果を、MMP-7 注入と生理食塩水注入につい
て示す図である。

図 11 は、ヘルニアを自然発症しているビーグル犬の椎間板に MMP-7 を注
入し、1 週間後に屠殺して作成した椎体標本をサフラニン O で染色した結果を示
す図である。

図 12 は、ヘルニアを自然発症しているビーグル犬の椎間板にコントロールと
しての生理食塩水を注入し、1 週間後に屠殺して作成した椎体の組織標本をサフ
ラニン O で染色した結果を示す図である。

図 13 は、MMP-7 によるプロテオグリカンの分解を試験したウェスタンブ
ロット法の結果を示す図である。

図 14 は、イヌの椎間板ヘルニアにキモパペインを注射して、注射後 1 週間に
屠殺して作成した病理標本をサフラニン O で染色した結果を示す図である。

発明を実施するための最良の形態

本発明は、1 または複数のヒト由来の蛋白質分解酵素を有効成分として含有し、
椎間板変性に伴う疾患の患部に直接投与される椎間板変性に伴う疾患の治療剤で
ある。特には椎間板ヘルニア、腰痛症、椎間板症、変形性脊椎症の治療剤である。
有効成分とする蛋白質分解酵素は細胞外マトリックス分解酵素であり、例えば、
MMP-3、MMP-7、MMP-8、MMP-13、MT1-MMP (MMP
-14) およびアグリカネース (aggrecanase) である。

本発明の椎間板変性に伴う疾患の治療剤は、例えばヘルニア患部に直接投与さ
れる。また、本発明の治療剤の投与方法としては、ヘルニア近傍の椎間板内に投
与する場合も含まれる。例えば椎間板穿刺でレントゲン透視下に経皮的に穿刺針
を進め、椎間板内に穿刺する。そこから、脱出椎間板ヘルニア方向に内筒を進め

て脱出したヘルニアに選択的に穿刺して、本発明の薬剤を注入する。または硬膜外腔注射により投与することができる。本発明の治療剤をこのように投与することによってヘルニアの自然退縮を促進させることができる。

本発明の椎間板変性に伴う疾患の治療剤の使用に際しては、神経症状で神経根症や馬尾症、脊髄症などの神経症状を有し、磁気共鳴画像法（MR I）により神経圧迫の状態および椎間板変性、例えばヘルニアの部位並びに程度を確認するという診断が必要である。また、椎間板造影検査により、治療を行う部位のヘルニア塊を造影して椎間板ヘルニアの部位並びに程度を正確に判断することが重要である。

従って、本発明の一態様は、椎間板変性例えばヘルニアの疑いがある患者に対してMR I と椎間板造影検査を実施し、患者に椎間板変性例えばヘルニアが認められた場合には、その病態に応じて本発明のヒト由来の蛋白質分解酵素をヘルニア患部に直接投与して、ヘルニア組織の自然退縮を促進する椎間板ヘルニアの治療方法である。

本発明の椎間板変性に伴う疾患の治療剤の投与量は、椎間板変性例えばヘルニアの程度、患者の状態、蛋白質分解酵素の種類等により異なる。本発明の椎間板変性に伴う疾患の治療剤は、患部に直接投与され、その投与量は通常1回当たり約 $1\mu\text{g}$ ～ 100mg 、好ましくは $100\mu\text{g}$ ～ 1mg の範囲である。投与回数は、1回から数回が望ましいが、退縮の度合いを見てさらに多くすることができる。

実施例

本発明を下記の実施例によって具体的に説明するが、本発明はこれらに限定されるものではない。

実施例1 ヒト椎間板ヘルニア手術検体を用いた器官培養実験

手術時に摘出した腰椎椎間板ヘルニア検体（ 4°C にて保存）を、細かく切断し、湿重量を測定し、1検体を $60\sim 80\mu\text{g}$ となるように配分して、96ウェル（well）プレート内に入れた。ついで以下の試料溶液を加え、 37°C においてCO

2 インキュベーター内で24時間培養した。

(1) コントロール/DMEM培地 200 μ l

(2) ヒトリコンビナントMMP-3 (45kDa) 20 μ g/200 μ l

(3) ヒトリコンビナントMMP-7 (19kDa) 20 μ g/200 μ l

5 (4) ヒトリコンビナントMMP-3 10 μ g+ ヒトリコンビナントMMP-7 10 μ g/200 μ l

(5) ヒトリコンビナントMMP-3 20 μ g+ ヒトリコンビナントMMP-7 20 μ g/200 μ l

10 (6) キモパpain 1、5、10、50、100、500 pkt(picoKatal)/200 μ l

ヒトリコンビナントMMP-3 (CHEMICON 社) およびヒトリコンビナントMMP-7 (CHEMICON 社) は4℃でDMEM培地に溶解した。キモパpainはポジティブコントロールであり、キモパpain (ICN Biomedicals) を1mMのEDTA, 0.067mMのメルカプトエタノール、5.5mMのシステイン塩酸塩を含む液に溶かし、25℃、pH6.2で30分インキュベートし活性化してDMEM培地に添加した。

得られた培養物の湿重量を測定し、統計学的計算をした。その結果を図1に示す。図1から明らかなように、MMP-3、MMP-7を使用する場合および両者を併用する場合は、コントロールに比して湿重量が有意に減少する。

20 ついで、検体を4%パラホルムアルデヒドに入れ、組織標本を作成し、これをサフラニンO染色した結果を図2に示す。その結果、MMP-3、MMP-7またはキモパpainを加えて器官培養したものは、コントロールと比較して優位に染色性の低下(ヘルニアの退縮)を示した。

実施例2 ウサギ椎間板への注入実験

25 日本白色ウサギ(3~4kg)を以下の手順で処理し、薬剤の椎間板内注入による効果を検定した。

1. ケタミン塩酸塩0.5~1.0ml/kgを皮下注射することにより、前投薬処

理をした。

2. 体を固定し、耳の静脈に23Gトンボ針でラインを取りテープで固定（ライン確保）した。ペントバルビタールナトリウムを生理食塩水で半分の濃度に薄め（0.5mg/ml）、0.5～1.0ml/kg をワンショットで注射し静脈麻酔した。

5 その後は適宜1ml ずつを注射する。バリカンで体毛を刈り、半側臥位に固定した（後側方アプローチ）。

3. ドレーピング、電気メス（エアトーム）セットを用い、皮を切り、皮下を展開して、椎体、肋骨から筋肉を剥離し椎間板を露出した。

4. 椎間板に直接的に次の薬剤を注入した。

10 (1) ヒトリコンビナントMMP-3 10 μ g / 100 μ l および40 μ g / 100 μ l (Microcon YM-3 で濃縮したもの)

(2) ヒトリコンビナントMMP-7 10 μ g / 100 μ l および40 μ g / 100 μ l (Microcon YM-3 で濃縮したもの)

(3) キモパパイン 1kpt および5kpt

15 (1mM のEDTA、0.067mM のメルカプトエタノール、5.5mM のシステイン塩酸塩を含む液に溶かして25℃、pH6.2で30分インキュベートして活性化して使用した)

(4) コントロール：生理食塩水（NS:normal saline）

20 薬剤は100 μ l を椎間板内に注入した。濃度の異なる薬剤を2個所の椎間板に、生理食塩水のみを1個所の椎間板に投与し、マーキング用ワイヤーを椎体に埋め込んだ。

5. ナイロン針で各層を閉じ、ウサギをケージ内でフリーにした。

25 6. 注射1週後、ケタミン塩酸塩3ml を注射し、ライン確保した後、耳静脈に23Gトンボ針を固定し、ペントバルビタールナトリウム（1mg/ml）3ml を投与（全量で5～7ml）した。

7. 椎体を一まとめにして(en bloc) 摘出し、4%ホルマリン溶液で固定して、組織標本を作成した。

8. 組織標本を脱パラフィンし、1%酢酸水溶液に溶かした0.03%ファーストグリーンで5分間染色した。ついで、1%酢酸水溶液で洗浄後、0.25%サフラニンOで7分間染色した。

5 その結果を図3に示す。コントロールと比較してMMP-3、MMP-7およびキモパイン注入群は有意に染色性が低下した。また、MMP-3注入群は椎間板狭小化が認められた。

実施例3 イヌ椎間板ヘルニアへの注入実験

10 イヌ特にビーグル犬などは高率に椎間板ヘルニアに罹患し、重症の場合は両下肢麻痺等の症状を呈する。イヌのヘルニアの組織像は、ヒトのヘルニアの組織像と非常に類似している。ヘルニアに罹患し下肢麻痺を起こしたミニチュアダックスフンド7才、6.35kgの第1~第2腰椎椎間板ヘルニアを外科的に摘出した組織を標本とし、ヘマトキシリンエオジン染色し、顕微鏡写真に撮影した結果を図4として示す。この組織標本は、イヌのヘルニアがヒトのヘルニアモデルとして非常に適切であることを示している。

15 椎間板ヘルニアを自然発症したビーグル犬の椎間板ヘルニアに薬剤を注入してその効果を次のように検討した。ヒトリコンビナントMMP-7の試験には7才、体重12.75kgのビーグル犬を、ヒトリコンビナントMMP-3の試験には7才、体重14.4kgのビーグル犬を用いた。薬剤の注入前に椎間板のMRIを撮影して、正常な椎間板高位、変性している高位、ヘルニアを認める高位を確認した。

20 MMP-7の投与：ビーグル犬の第12胸椎(T12)と第13胸椎(T13)の間の椎間板に20 μ g/200 μ l、第13胸椎(T13)と第1腰椎(L1)の間の椎間板および第1腰椎(L1)と第2腰椎(L2)の間の椎間板に10 μ g/100 μ l注入した。コントロールとして、第2腰椎(L2)と第3腰椎(L3)の間の椎間板に生理食塩水を200 μ l注入した。

25 MMP-3の投与：ビーグル犬の第11胸椎(T11)と第12胸椎(T12)の間の椎間板に10 μ g/100 μ l、第12胸椎(T12)と第13胸椎

(T 1 3) の間の椎間板に $20 \mu\text{g}/200 \mu\text{l}$ 、第 1 3 胸椎 (T 1 3) と第 1 腰椎 (L 1) の間の椎間板に $10 \mu\text{g}/100 \mu\text{l}$ 注入した。第 1 0 胸椎 (T 1 0) と第 1 1 胸椎 (T 1 1) の間の椎間板にコントロールとして生理食塩水を $200 \mu\text{l}$ 注入した。

- 5 薬剤の椎間板内への注入はレントゲン透視下に脊椎針 (Spinal Needle) を用いて行った (図 5)。シリンジはツベルクリン用 (全量 1 ml) を用いた。注入後 1 週間後に再度 MRI を測定した。注入前と注入後の椎間板の MRI を図 6 ~ 8 に示した。

- 図 6 は MMP-7 を用いた場合の結果を示す MRI の T 1 強調画像であり、図 7 は MMP-7 を用いた場合の結果を示す MRI の T 2 強調画像である。T 1 強調画像はヘルニア実質を見るのに有効であり、T 2 強調画像は軟骨組織である椎間板の分解をみるのに有効である。注入前の T 1 2 と T 1 3 の間に観察されたヘルニアは、注入後の画像において明瞭な退縮をしている。図 8 は、MMP-3 を用いた場合の結果を示す水分強調画像 (T 2) であり、薬剤投与によるヘルニア
10 の退縮が観察される。
15

- ついで、MMP-7 を投与したビーグル犬を屠殺し、注入した椎間板を含む脊椎ユニットを一まとめにして摘出し、4 % パラホルムアルデヒド溶液で固定して脱灰操作を行ってから、組織標本を作成した (図 9)。詳しくは、4 % パラホルムアルデヒド溶液で固定した後、10 mM PBS で洗浄、エタノールおよびクロロホルムにて脱脂を行う。次いで、脱灰液 (Plank Rychlo method: Wako, Japan) を用いて脱灰操作を行った。脱灰が十分なことを確認し、パラフィン包埋を行い、組織標本を作成した。
20

- その組織標本を脱パラフィン後、1 % 酢酸水溶液に溶かした 0.03 % ファーストグリーンで 5 分間染色した。ついで、1 % 酢酸水溶液で洗浄後、0.25 % サフラニン O で 7 分間染色した。
25

その切片の写真 (マクロ図) を図 10 に示した。MMP-7 注入後とあるのは、MMP-7 を $200 \mu\text{l}$ 注入した部位 (第 1 2 胸椎と第 1 3 胸椎間) の切片であ

り、生食注入後とあるのは、生理食塩水を注入した第2腰椎と第3腰椎の間の切片である。その切片をさらに詳細に示したものが、図11および図12である。図11はMMP-7を注入したものであり、その左上隅には図10の下段と同じマクロ図が示されている。中段はマクロ図を2倍に拡大したものであり、下段は2倍拡大図の一部をさらに10倍に拡大したものである。図12は、生理食塩水を注入したものであり、その左上隅がマクロ図、中段が2倍拡大図、下段がその10倍拡大図である。図10、図11および図12を比較すると、MMP-7を注入した場合には、生理食塩水の場合と比較して、染色性が著しく低下している。これはMMP-7の注入によって髄核内の構造が破綻したことを示している。これに対し、生理食塩水の場合の髄核構造の乱れは、注入個所のみであり、染色性は維持されている。このことから、軟骨基質の破壊は認められない。

さらに、MMP-7を注入した図11では、MMP-7が注入された髄核は分解されたマトリックスとなっているが、その他の髄核部や線維輪には正常の軟骨細胞が温存されている。したがって、正常な軟骨細胞が軟骨マトリックスを産生して椎間板を再生する機能を保持していると結論される。

実施例4 イヌ椎間板ヘルニアを用いた分子生物学的検討

実施例3と同様に、椎間板ヘルニアを自然発症している、ビーグル犬（7才、体重14.0kg）の第2頸椎（C2）と第3頸椎（C3）の間の椎間板にMMP-7を20 μ g/200 μ l、第3頸椎（C3）と第4頸椎（C4）の間の椎間板に生理食塩水200 μ lを注入した。注入1週間後に椎間板からタンパク抽出を行い、ヒト成人軟骨のプロテオグリカン抗体を用いて、椎間板内軟骨の分解についてウエスタンブロッティングによる分子生物学的検討を行った。ヒト成人軟骨のプロテオグリカン抗体はイヌの交差が確認されており、コアタンパクとケラタン硫酸側鎖を認識することが確認されている。

ビーグル犬を屠殺したのち、できるだけ早く脊椎ユニットを摘出し氷中にて保存する。次に目的とする部位の椎間板組織を、他の組織が混入しないように注意してメスなどを用いて分離する。採取した組織を10cm ディッシュに入れ、

RIPA(Radio Imuno Precipitation Assay) 緩衝液 4ml にプロテイナーゼ阻害剤の錠剤 (Roche: proteinase inhibitor cocktail tablets) 1 個を溶かした溶液を加えてディッシュ内で破碎する。R I P A 緩衝液の組成は 1 5 0 mM NaCl、1 %Triton-100、0. 5 %デオキシコール酸ナトリウムおよび 0. 1 %SDS を含む
5 5 0 mM トリス塩酸緩衝液 (p H 8. 0) である。4℃にて、一晚攪拌した後、ディッシュ内の溶液を採取して、4℃、3 0 0 0 rpm、5 分遠心する。その上清を、抽出タンパクとして実験に用いた。

ビーグル犬の椎間板からのタンパクの他、膝関節周囲の骨腫瘍の摘出手術の際に得られたヒトの正常膝軟骨から抽出したタンパクをポジティブコントロールとして用いた。
10

各タンパクの抽出液をプロテインアッセーにて濃度を調整した上で、Laemmli Sample Buffer を加え、9 5℃、3 分間ボイルし、1 2 %ゲル (第一化学、PAG ミニゲル) を用いて、SDS-PAGE を行った (8 0 V、1 8 0 分)。続いて、ニトロセルロース膜に転写した (0. 1 A、4 5 分)。これに Chemicon (Temecula, CA, USA) 社製のヒト成人軟骨プロテオグリカン抗体を反応させ、ついで ECL kit (Amersham Pharmacia Biotech, UK) によって発色させた。その結果を図 13 に示した。図中Mは分子量マーカーであり、P Cはヒトの正常な膝軟骨から抽出したタンパクを用いたポジティブコントロールであり、C 2 / 3 はMMP-7 を注入した椎間板から抽出したタンパクであり、C 3 / 4 は生理食塩水を注入した椎
15 間板から抽出したタンパクであり、C 5 / 6 は無処理の椎間板 (第 5 頸椎と第 6 頸椎の間) から抽出したタンパクである。
20

4 0 k D a から 1 0 0 k D a までのバンドはG 1 ドメインを含むコアタンパクとケラタン硫酸側鎖を示している。バンドが単一でないのは、臨床検体であるために、生理的酵素などによるプロテオグリカンの分解度によっていくつかの分解
25 産物が存在することを表している。ヒトの正常な膝軟骨から抽出したタンパクを用いたポジティブコントロール (P C) の場合は、様々なMMPやアグリカネーヌなどのプロテオグリカン分解酵素が存在するため、プロテオグリカンの分解産

物が検出された。生理食塩水注入の場合（C 3 / 4）および無処理の場合（C 5 / 6）でも、プロテオグリカンの分解物が検出された。これらと比較して、MMP-7 注入の場合はプロテオグリカンの分解産物の量は明らかに減少している。これは、MMP-7 が椎間板ヘルニア内のプロテオグリカンを分解した結果である。

手術で除去されたヘルニア検体を用いた器官培養実験（実施例 1）により、MMP-3 および MMP-7 がヘルニアを分解することが明らかとなった。また、ウサギ椎間板への注入実験（実施例 2）、ビーグル犬の自然発症ヘルニアへの注入実験（実施例 3）およびイヌ椎間板ヘルニアを用いた分子生物学的検討（実施例 4）により、MMP-3 および MMP-7 の椎間板内注入により椎間板および椎間板ヘルニアのマトリックス分解が起きることが明らかとなった。これらの事実から、MMP-3 および MMP-7 が椎間板ヘルニア治療に有効であることが確認された。

参考例

イヌの椎間板ヘルニアにキモパpainを注射して注射後 1 週間で屠殺し、実施例 3 と同様に病理標本を作製し染色した。これを図 1 4 に示す。この場合には、軟骨のマトリックスが髄核部と線維輪全体にわたって分解され、残存した軟骨細胞も非常に少ない。したがって、キモパpainをヘルニア患部に注入した場合には、正常な軟骨細胞が損傷を受けるため、椎間板再生能は本発明の MMP-7 の注入と比較して、明らかに椎間板再生能が低いと結論される。

産業上の利用可能性

MMP-3 および MMP-7 のような、ヒト由来の蛋白質分解酵素を椎間板変性に伴う疾患の患部に直接投与する本発明の椎間板変性に伴う疾患の治療剤によって、その疾患を速やかに治療することができる。その疾患は、例えば椎間板ヘルニア、腰痛症、椎間板症、変形性脊椎症である。ヒト由来の蛋白質分解酵素は、これまで臨床応用されたキモパpainのような植物由来の酵素と比べて、アナフ

イラキシーなどの重篤な免疫反応の発症がなく、しかも正常な軟骨細胞を損傷しない点で極めて優れている。

請求の範囲

1. 1または複数のヒト由来の蛋白質分解酵素を有効成分として含有し、椎間板変性に伴う疾患の患部に直接投与されることを特徴とする椎間板変性に伴う疾患の治療剤。

5

2. 椎間板変性に伴う疾患が、ヘルニア、腰痛症、椎間板症または変形性脊椎症である請求項1記載の治療剤。

3. ヒト由来の蛋白質分解酵素が細胞外マトリックス分解酵素である請求項1または2記載の治療剤。

10

4. MMP-3、MMP-7、MMP-8、MMP-13、MT1-MMPおよびアグリカネース (aggrecanase) からなる群から選択される1または複数の細胞外マトリックス分解酵素を有効成分として含有する請求項1～3のいずれかに記載の治療剤。

15

図 1

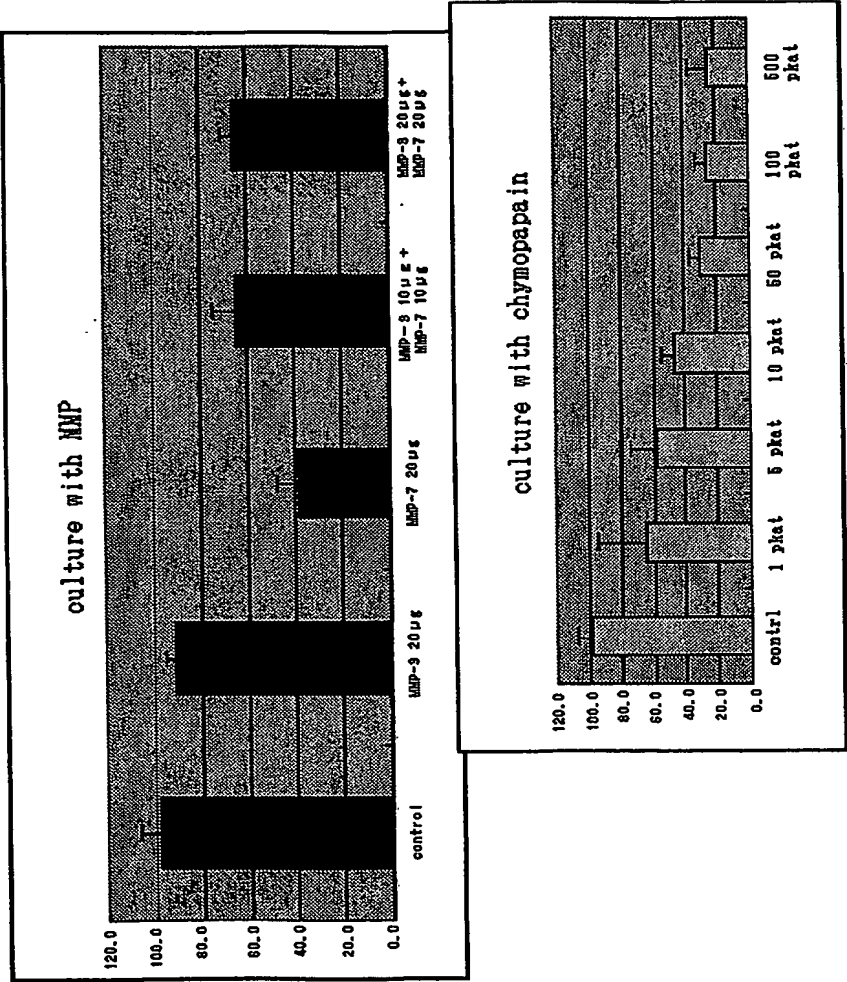
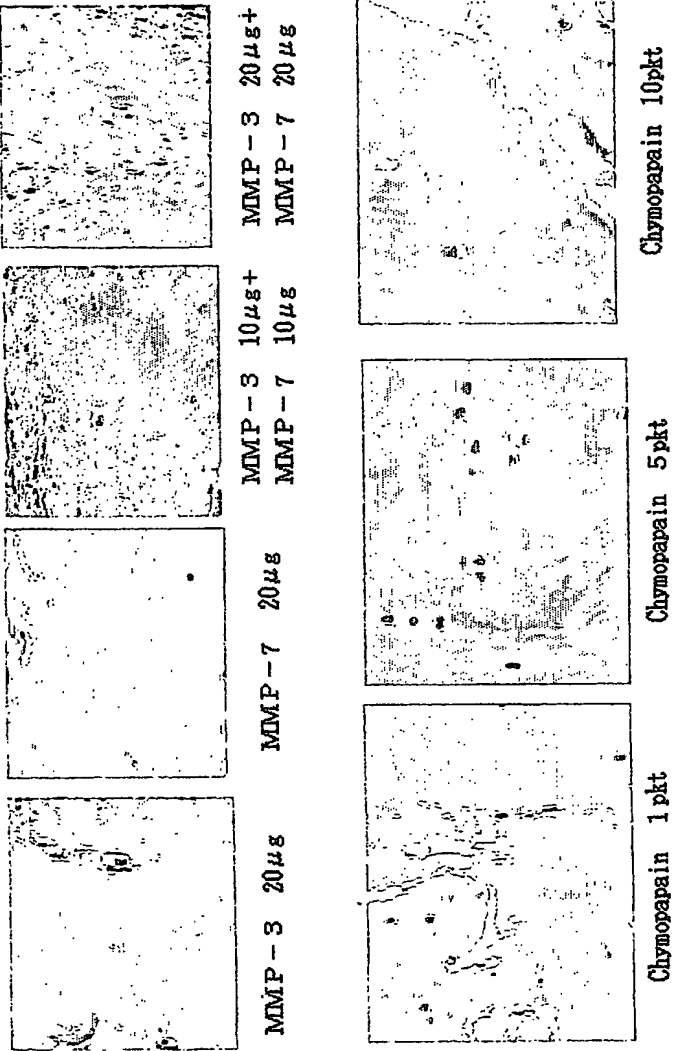
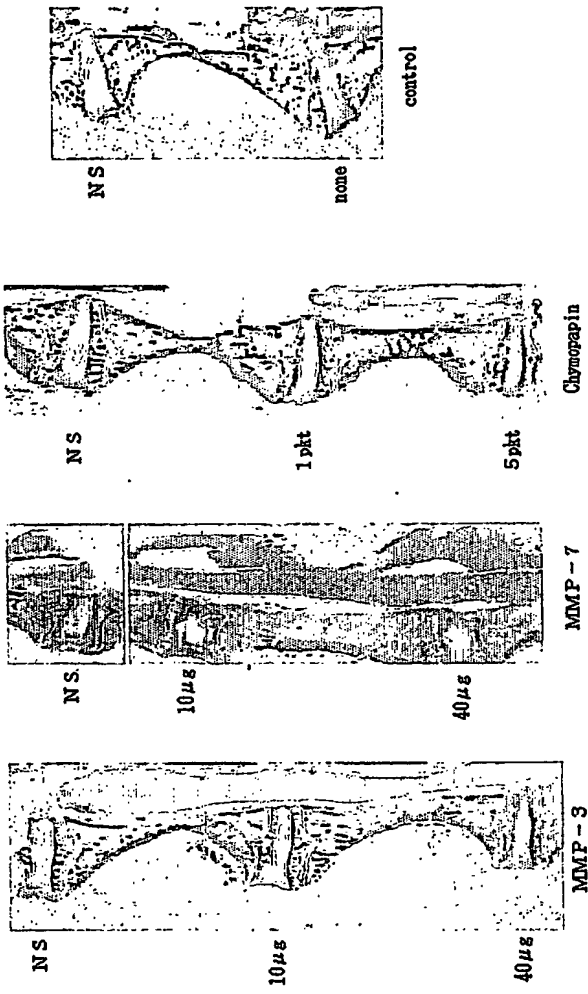


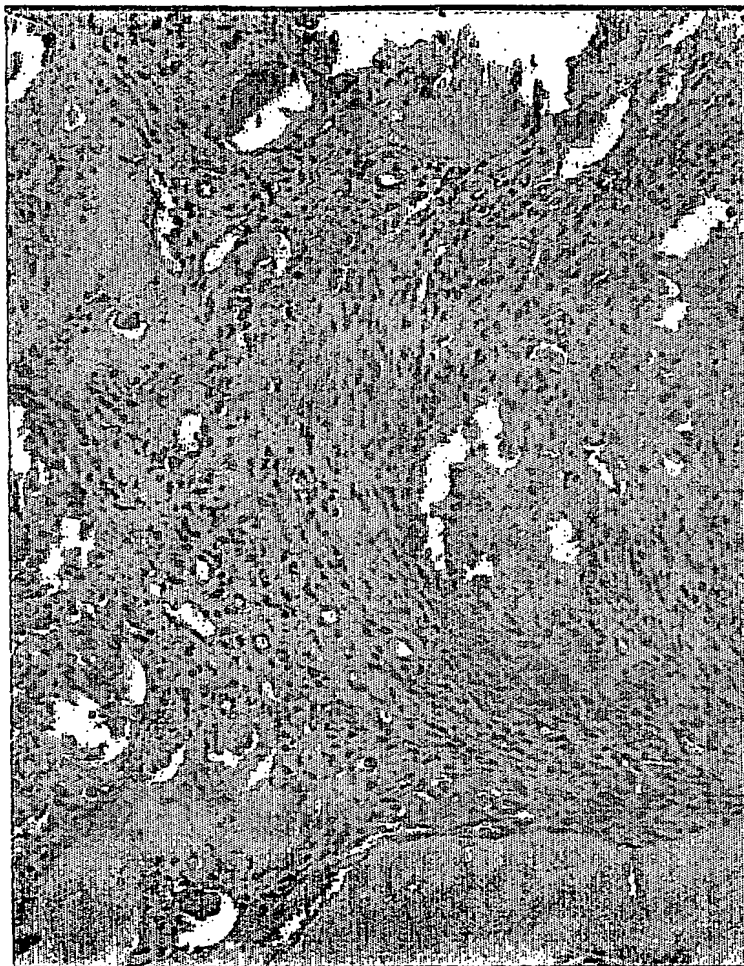
図 2



3/14



イヌヘルニア検体 (HE)

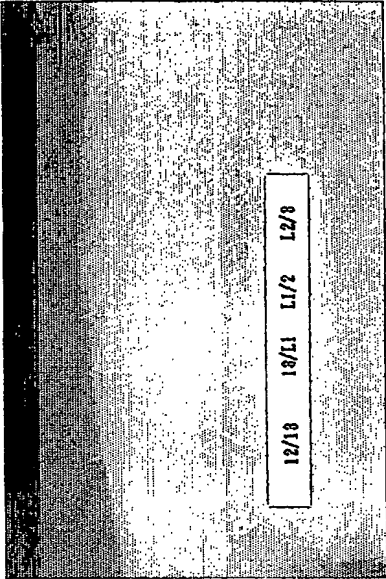


5

MMP-7 投与



10/18
No. 2 Beagle
79.0. 12.75kg
MMP-7
12/18 MMP-7 200
18/1 100
L1/2 100
L2/3 NS 100

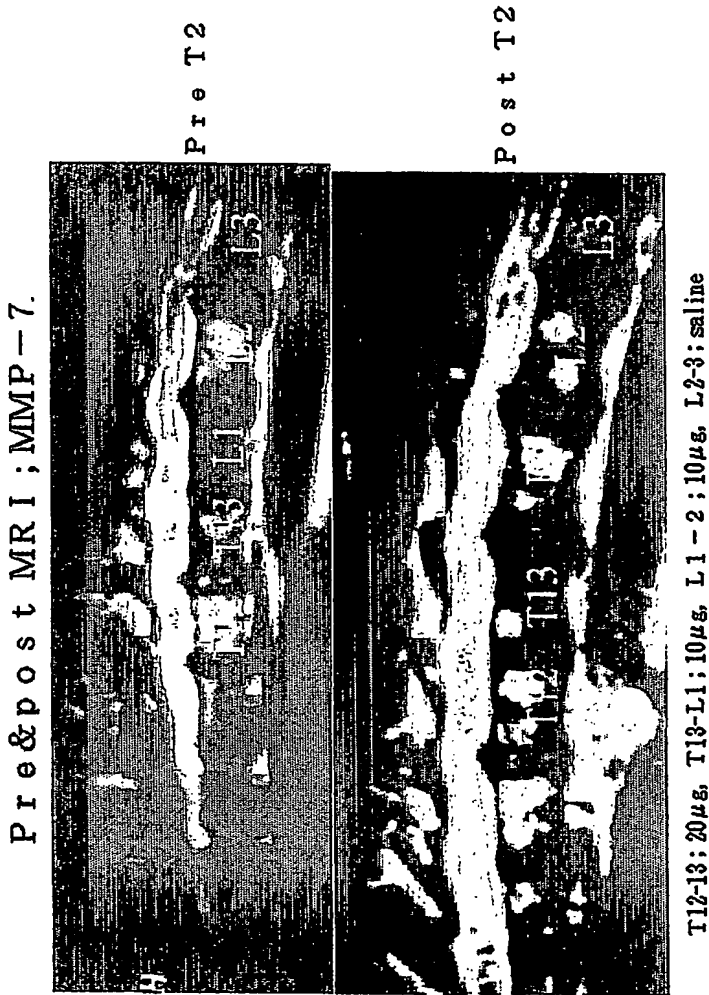


12/18 18/L1 L1/2 L2/3

図 6



図 7



8/14

図 8

Pre&post MRI ; MMP-3



Post T2



図 9

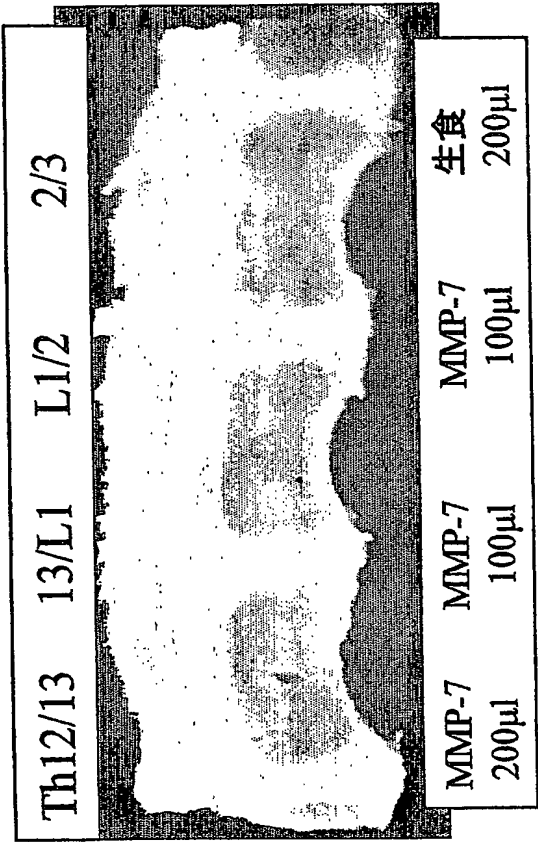
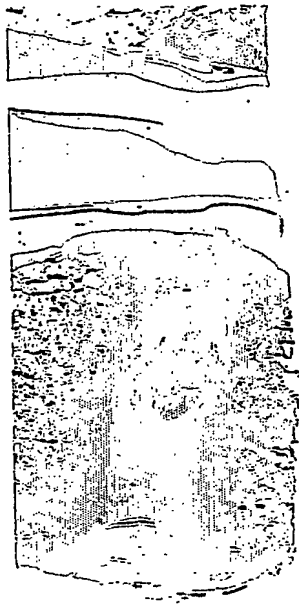


図 1 0



生食 注入後



MMP-7 注入後

マクロー, サフラニンO 染色

図 1 1

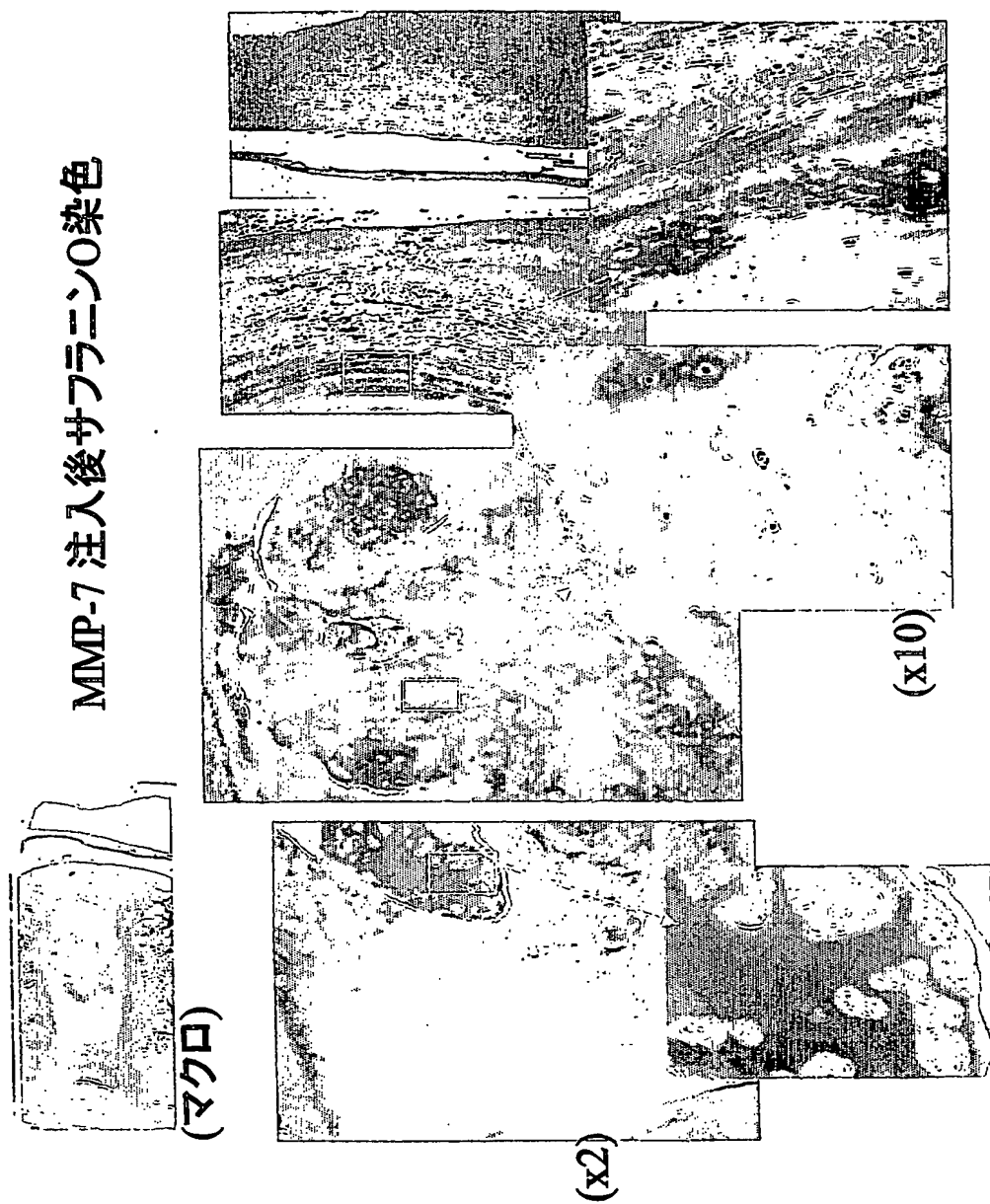
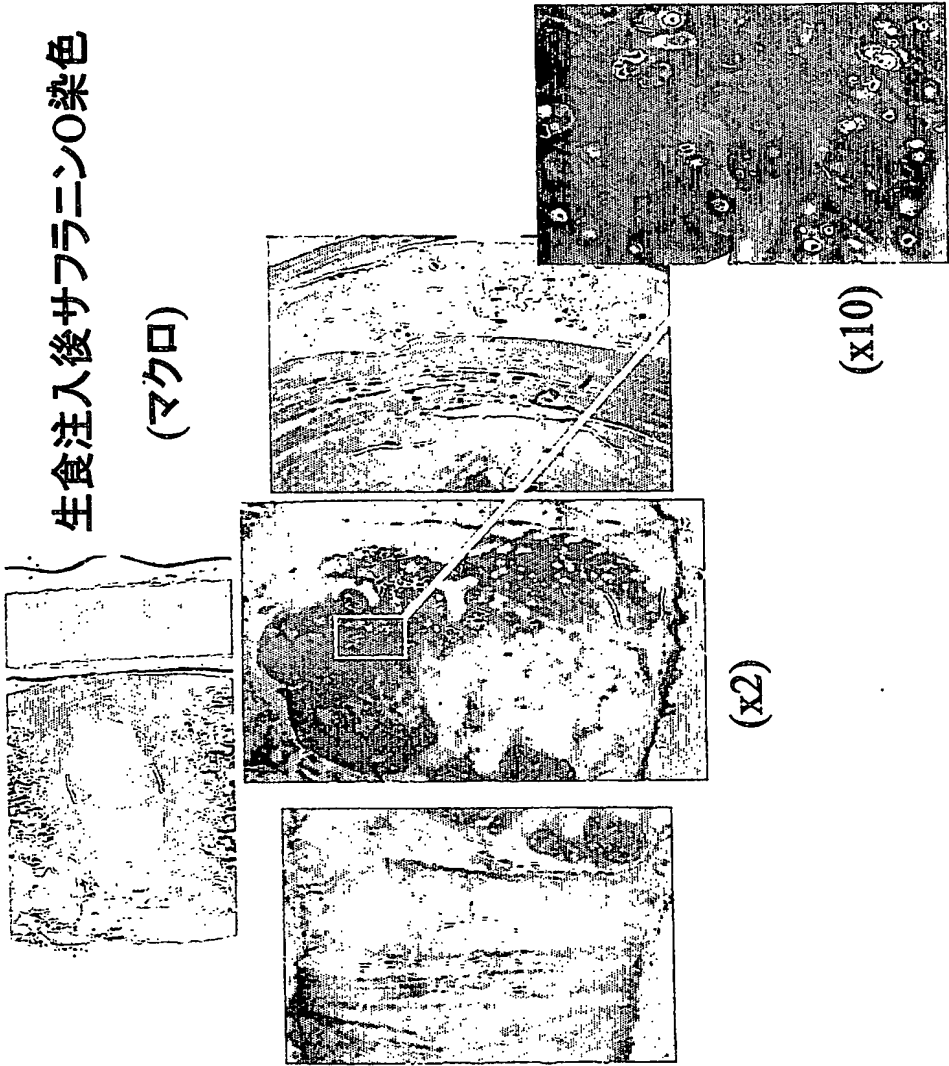
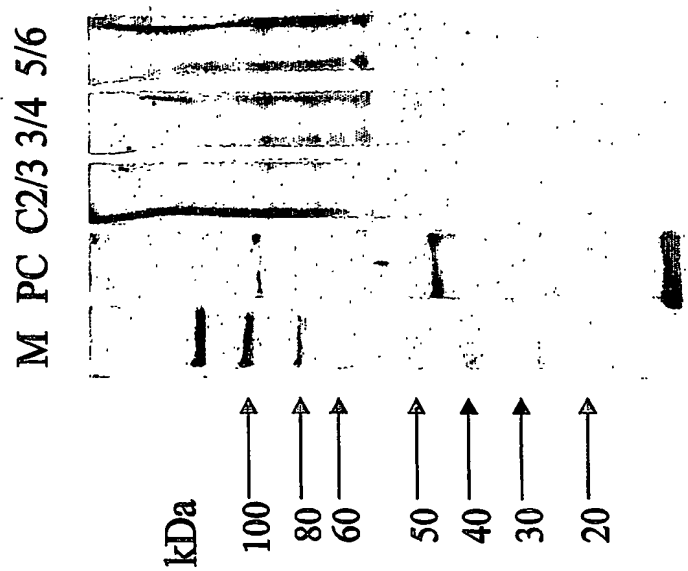


図 1 2



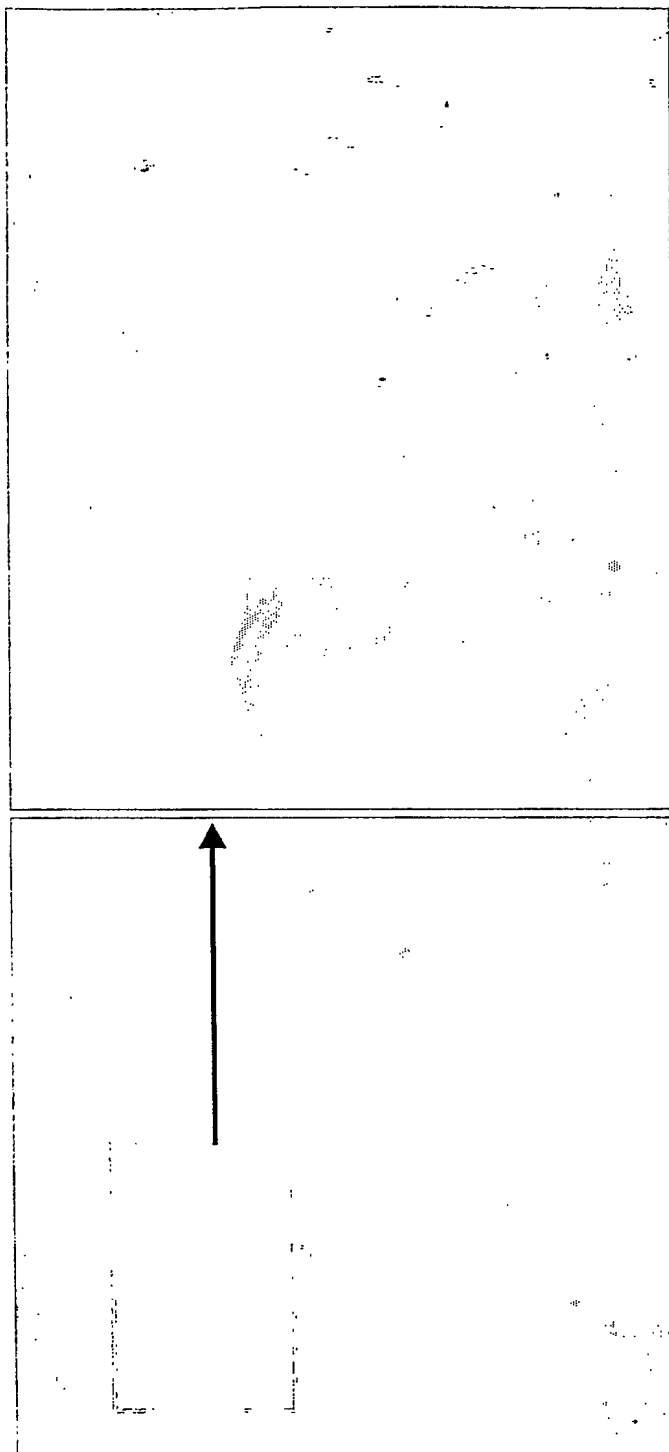
13/14

図 1 3



C2/3: MMP-7, C3/4: 生食,
C5/6: 無処理
PC: ポジティブコントロール (正常膝軟骨)

14/14



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/JP03/16580

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl⁷ A61K38/46, A61P19/00, 19/08

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl⁷ A61K38/46, A61P19/00, 19/08

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
CAPLUS (STN), MEDLINE (STN), EMBASE (STN), BIOSIS (STN), JICST (JOIS)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	JP 11-169176 A (Yamanouchi Pharmaceutical Co., Ltd.), 29 June, 1999 (29.06.99), Particularly, abstract; Claims & Chem.abstr., 1999, Vol.131 (Columbus, OH, USA), the abstract No.113133	1-4
X	Hiroataka HARO et al., "Suikanban Hernia Taishuku Kijo de Sayo suru MMP", Connective Tissue, 2001, Vol.33, No.1, pages 51 to 57; particularly, abstract; page 55, right column, line 8 to page 56, right column, line 14	1-4

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"E" earlier document but published on or after the international filing date	"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	"&" document member of the same patent family
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	

Date of the actual completion of the international search
06 April, 2004 (06.04.04)

Date of mailing of the international search report
11 May, 2004 (11.05.04)

Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP03/16580

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	Hiroataka HARO et al., "Suikanban de Sayo suru Matrix Metalloprotease (MMP) -Suikanban Hensei kara Suikanban Hernia made-", Rneumatism, 2001, Vol.41, No.1, pages 44 to 50; particularly, page 44, right column, line 31 to page 46, right column, line 21	1-4
X A	EP 1111047 A2 (Takeda Chemical Industries, Ltd.), 27 June, 2001 (27.06.01), Particularly, abstract; Claims & WO 00/14227 A1 & US 6680189 B1 & JP 2000-139480 A & CA 2341327 A & AU 9954479 A1	1-3 4
X A	HERRON, L. et al., Does the MMPI predict chemonucleolysis outcome?., Spine, 1988, Vol.13, No.1, pp.84-8; particularly, abstract	1-3 4
X A	SAGONA, M.A. et al., Pretreatment serum levels of IgE to chymopapain in reactive patients., Annals of allergy, 1985, Vol.55; No.5, pp.674-7; particularly, abstract	1-3 4
X A	EINARSON, T.R. et al., Chymopapain., Drug intelligence & clinical pharmacy, 1984, Vol.18, No.7-8, pp.560-8; particularly, abstract	1-3 4
X A	BENOIST M. et al., La chimionucleolyse dans le traitement des sciatiques discales. 120 observations., La Nouvelle presse medicale, 1982, Vol.11, No.28, pp.2121-4; particularly, abstract	1-3 4
X A	JP 10-99084 A (Takeda Chemical Industries, Ltd.), 21 April, 1998 (21.04.98), Particularly, abstract; Claims & Chem.abstr., 1998, Vol.129 (Columbus, OH, USA), the abstract No.13973	1-3 4
X A	WO 97/40157 A1 (TAKEDA CHEMICAL INDUSTRIES, LTD.), 30 October, 1997 (30.10.97), Particularly, abstract; Claims & EP 897426 A1 & US 6566116 B1 & US 2003099631 A1 & JP 10080283 A & CA 2252509 A & AU 9724064 A1	1-3 4

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP03/16580

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X A	WO 90/13561 A1 (BOOTS CO. PLC., UK), 15 November, 1990 (15.11.90), Particularly, abstract; Claims & EP 470136 A1 & EP 470136 B1 & US 5380656 A & JP 4-506003 A & IN 170683 A & CA 2056402 A & CN 1047340 A & AU 9055472 A1 & AU 631641 B2 & ZA 9003228 A & DD 296960 A5 & HU 58345 A2 & ES 2055427 T3 & IL 94227 A1 & PL 166810 B1 & RU 2074891 C1 & RO 112032 B1 & NO 9104206 A & IN 173230 A & LV 10200 B & LT 3827 B & US 5468480 A	1-3 4
X A	BUTTLE, David J., Chemonucleolysis: an example of therapeutic tissue damage, Research Monographs in Cell and Tissue Physiology, 1988, Vol.15, (Control Tissue Damage), pp.269-78, particularly, abstract	1-3 4
X A	TROISIER O. et al., Traitement des lombo- sciatiques par injection intra-discale d'enzymes proteolytiques (nucléolyse).80 observations., La Nouvelle presse medicale, 1980, Vol.9, No.4, pp.227-30; particularly, abstract	1-3 4
X A	KUDO, Tadaaki et al., Experimental chemonucleolysis with chymopapain in canine intervertebral disks, Journal of Veterinary Medical Science, 1993, Vol.55, No.2, pp.211-15; particularly, abstract	1-3 4
X A	Chem.abstr., 1973, Vol.78 (Columbus, OH, USA), the abstract No.106001, AVAKYAN, A.V., Effect of the proteolytic enzymes trypsin and chymopsin on an intervertebral disk under experimental conditions, Eksperimental'naya Khirurgiya i Anesteziologiya, 1972, (5), 23-5	1-3 4
A	ROBERTS, S. et al., Matrix metalloproteinases and aggrecanase: their role in disorders of the human intervertebral disc., Spine, 2000, Vol.25, No.23, pp.3005-13	1-4

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int.Cl¹ A61K38/46, A61P19/00, 19/08

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int.Cl¹ A61K38/46, A61P19/00, 19/08

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

CAPLUS(STN), MEDLINE(STN), EMBASE(STN), BIOSIS(STN), JICST(JOIS)

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X	JP 11-169176 A(山之内製薬株式会社)1999.06.29 特に、【要約】、【特許請求の範囲】 & Chem. abstr., 1999, Vol.131(Columbus, OH, USA), the abstract No.113133	1-4
X	波呂 浩孝 等、椎間板ヘルニア退縮機序で作用するMMP、 Connective Tissue, 2001, Vol.33, No.1, pp.51-57, 特に、Abstract, 第55ページ右欄第8行-第56ページ右欄第14行	1-4

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

- 「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの
「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)
「O」 口頭による開示、使用、展示等に関する文献
「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

- の日の後に公表された文献
「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの
「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの
「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの
「&」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

06.04.2004

国際調査報告の発送日

11.5.2004

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)

郵便番号 100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

滝田 浩一

4C

9284

電話番号 03-3581-1101 内線 3452

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X	波呂 浩孝 等、椎間板で作用するマトリックスメタロプロテアーゼ (MMP) —椎間板変性から椎間板ヘルニアまで—、リウマチ、2001、第41巻、第1号、第44—50ページ 特に、第44ページ 第右欄第31行—第46ページ 右欄第21行	1—4
X A	EP 1111047 A2(Takeda Chemical Industries, Ltd.)2001.06.27 特に、Abstract, Claims & WO 00/14227 A1 & US 6680189 B1 & JP 2000-139480 A & CA 2341327 A & AU 9954479 A1	1—3 4
X A	HERRON, L. et al., Does the MMPI predict chemonucleolysis outcome?., Spine, 1988, Vol.13, No.1, pp.84-8 特に、Abstract	1—3 4
X A	SAGONA, M. A. et al., Pretreatment serum levels of IgE to chymopapain in reactive patients., Annals of allergy, 1985, Vol.55, No.5, pp.674-7 特に、Abstract	1—3 4
X A	EINARSON, T. R. et al., Chymopapain., Drug intelligence & clinical pharmacy, 1984, Vol.18, No.7-8, pp.560-8 特に、Abstract	1—3 4
X A	BENOIST M et al., La chimionucleolyse dans le traitement des sciatiques discales. 120 observations., La Nouvelle presse medicale, 1982, Vol.11, No.28, pp.2121-4 特に、Abstract	1—3 4
X A	JP 10-99084 A(武田薬品工業株式会社)1998.04.21 特に、【要約】、【特許請求の範囲】 & Chem. abstr., 1998, Vol.129(Columbus, OH, USA), the abstract No.13973	1—3 4
X A	WO 97/40157 A1(TAKEDA CHEMICAL INDUSTRIES, LTD.) 1997.10.30 特に、Abstract, Claims & EP 897426 A1 & US 6566116 B1 & US 2003099631 A1 & JP 10080283 A & CA 2252509 A & AU 9724064 A1	1—3 4

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X A	WO 90/13561 A1(BOOTS CO. PLC, UK)1990.11.15 特に、Abstract, Claims & EP 470136 A1 & EP 470136 B1 & US 5380656 A & JP 4-506003 A & IN 170683 A & CA 2056402 A & CN 1047340 A & AU 9055472 A1 & AU 631641 B2 & ZA 9003228 A & DD 296960 A5 & HU 58345 A2 & ES 2055427 T3 & IL 94227 A1 & PL 166810 B1 & RU 2074891 C1 & RO 112032 B1 & NO 9104206 A & IN 173230 A & LV 10200 B & LT 3827 B & US 5468480 A	1 - 3 4
X A	BUTTLE, David J., Chemonucleolysis: an example of therapeutic tissue damage, Research Monographs in Cell and Tissue Physiology, 1988, Vol.15(Control Tissue Damage), pp.269-78 特に、Abstract	1 - 3 4
X A	TROISIER O et al., Traitement des lombo-sciatiques par injection intra-discal d'enzymes proteolytiques (nucléolyse). 80 observations., La Nouvelle presse medicale, 1980, Vol.9, No.4, pp.227-30. 特に、Abstract	1 - 3 4
X A	KUDO, Tadaaki et al., Experimental chemonucleolysis with chymopapain in canine intervertebral disks, Journal of Veterinary Medical Science, 1993, Vol.55, No.2, pp.211-15 特に、Abstract	1 - 3 4
X A	Chem. abstr., 1973, Vol.78(Columbus, OH, USA), the abstract No.106001, AVAKYAN, A. V., Effect of the proteolytic enzymes trypsin and chymopsin on an intervertebral disk under experimental conditions, Eksperimental'naya Khirurgiya i Anesteziologiya, 1972, (5), 23-5	1 - 3 4
A	ROBERTS, S et al., Matrix metalloproteinases and aggrecanase: their role in disorders of the human intervertebral disc., Spine, 2000, Vol.25, No.23, pp.3005-13.	1 - 4

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ BLACK BORDERS
- ☐ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- ☒ FADED TEXT OR DRAWING
- ☒ BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING
- ☒ SKEWED/SLANTED IMAGES
- ☐ COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS
- ☐ GRAY SCALE DOCUMENTS
- ☐ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT
- ☐ REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY
- ☐ OTHER: _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.